

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000156

International filing date: 24 January 2005 (24.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0400675  
Filing date: 23 January 2004 (23.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 01 April 2005 (01.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



PCT/FR 2005 / 000 156

09 FEV. 2005

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 FEV. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

23 JANV 2004

Réservé à l'INPI

INPI PARIS F

0400675

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE  
PAR L'INPI

23 JAN, 2004

Vos références pour ce dossier  
(facultatif) TLR4

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 030103

REMISE DES PIÈCES DATE LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  bioMérieux A l'attention de Elisabeth DORGET Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE	
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input checked="" type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Composition pour le traitement d'une pathologie associée à la MSRV/HERV-W			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		bioMérieux	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		16 73 62 03 99	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	16 92 80 MARCY L'ETOILE	
	Pays	France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.52.53 N° de télécopie (facultatif) 04.78.87.21.16	
Adresse électronique (facultatif)		anneloes.tuzet@eu.biomerieux.com	
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

**BR2**

23 JANV 2004

(Réserve à l'INPI)

REMISE DES PIÈCES DATE	INPI PARIS F
LIEU	0400675
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (N° 1)</b>	
Nom	DORGET
Prénom	Elisabeth
Cabinet ou Société	bioMérieux
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	PG 10871
Adresse	Rue
	Code postal et ville
	Pays
N° de téléphone (facultatif)	04.78.87.50.23
N° de télécopie (facultatif)	04.78.87.21.16
Adresse électronique (facultatif)	elisabeth.dorget@eu.biomerieux.com
<b>7 INVENTEUR(S)</b>	
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>	
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)	Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>	
Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/>	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint	<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», Indiquez le nombre de pages jointes	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>	
Elisabeth DORGET PG 10871 Ingénieur Brevets	
<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**cerfa**  
N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

**BR/SUITE**

~~23~~ JANV 2004

INPI PARIS F

0400675

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

**Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire**

DB 829 © WY /210103

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont mis en évidence l'expression importante de divers rétrovirus, notamment endogènes (HERVs), dans des pathologies telles que le diabète [1], la sclérose en plaques (SEP) [2] et la schizophrénie (SCZ) [3]. Les HERVs possèdent des homologies avec les rétrovirus animaux connus et proviennent probablement de leur intégration au sein de la lignée germinale humaine. Les séquences de ces HERVs dans le génome humain sont en général incomplètes même si des séquences provirales entières ont déjà été identifiées.

Des particules rétrovirales dans des cultures de cellules leptomeningées de patients atteints de SEP ont déjà été isolées [4]. L'étude de ces particules a montré qu'elles possédaient des séquences génétiques homologues à l'ADN humain définissant une nouvelle famille de rétrovirus endogènes (HERV-W) [2, 5, 6]. La présence de MSRV dans le sérum et/ou le liquide céphalo-rachidien de patients a maintenant été confirmée par différentes équipes [7-9] et une corrélation entre la charge virale et l'évolution de la maladie a été mise en évidence [10]. Il a ensuite été mis en évidence que MSRV et sa protéine d'enveloppe possédaient des propriétés pro-inflammatoires médiées par les lymphocytes T, de type superantigène (SAg) [11]. Un modèle animal (souris SCID humanisées) a été mis en place confirmant *in vivo* le potentiel immuno-pathogénique de telles particules et notamment leur capacité à induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, médiée par les lymphocytes T [12].

Dans la suite de la description les virus de la famille MSRV/HERV-W seront indifféremment dénommés MSRV ou MSRV/HERV-W.

Les présents inventeurs ont maintenant montré de manière inattendue que la protéine Env de MSRV/HERV-W a une autre activité pro-inflammatoire, indépendante de celle médiée par les lymphocytes T, passant par des cellules différentes des cellules T et par un récepteur différent du récepteur des cellules T (TCR), résultant dans l'activation d'une voie pro-inflammatoire différente de celle qui résulte de l'activation du TCR par un superantigène. Les inventeurs ont également trouvé que c'est précisément le domaine de la fraction soluble (Env-SU) de la protéine d'enveloppe de MSRV/HERV-W qui est responsable de ces nouveaux effets pro-inflammatoires médiés par des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, monocytes, cellules dendritiques et microgliocytes) et un récepteur non identifié, jusqu'à ce jour, pour son rôle dans le déclenchement des effets pro-inflammatoires médiés par Env-SU MSRV/HERV-W. Ainsi, Env-SU, naturellement présente à la surface des particules rétrovirales, cible les cellules présentatrices d'antigènes (APC) et induit la sécrétion de grandes quantités de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6. Ces effets pro-inflammatoires ont été étudiés chez des patients atteints de SEP puis comparés à ceux obtenus chez des donneurs. Les inventeurs ont ainsi montré que la production d'IL-6 induite par Env-SU était augmentée chez les patients SEP et était corrélée avec leur score clinique (EDSS). La présence élevée d'IL-6 dans le sérum, le LCR et les lésions de patients SEP [13-18] est présumée jouer un rôle important dans le développement et la persistance des lésions observées au niveau du système nerveux central des patients SEP.

Les présents inventeurs ont donc trouvé, de manière surprenante, que le récepteur de Env-SU impliqué dans ces effets pro-inflammatoires est la protéine TLR4 humaine (Toll-Like Receptor 4). Le gène codant pour TLR4 est localisé sur le chromosome 9 (9q32-q33). La protéine est constituée de 839

acides aminés et présente un poids moléculaire de 95679 Da. Il était connu que TLR4 coopérait avec une autre molécule appelée MD-2 et, qu'ensemble avec CD14, ce complexe est impliqué dans la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) bactériens conduisant à l'activation du facteur NF-kappa-B, à la sécrétion de cytokines et à la réponse inflammatoire, mais son rôle de récepteur de la fraction soluble de la protéine d'enveloppe (Env-SU) de MSRV/HERV-W n'était pas connu avant la présente invention.

10

D'autres pathologies présentent, comme la SEP, un profil d'activation du système immunitaire caractérisé par la présence de grandes quantités d'IL-6. Parmi elles, la schizophrénie (SCZ), - maladie neuropsychiatrique liée à des facteurs génétiques et environnementaux -, présente suivant les cas des quantités sérique d'IL-6 largement supérieures à la normale [19]. Par ailleurs, des séquences rétrovirales similaires à celles de MSRV ont été identifiées chez des patients SCZ[3]. Et, plus récemment, il a été démontré que le LCR de patients SCZ nouvellement diagnostiqués présentaient des séquences rétrovirales de la famille MSRV/HERV-W associées à des particules circulantes [20].

20

Une telle expression est compatible avec un rôle pour MSRV/HERV-W dans différentes pathologies neurologiques par l'intermédiaire des effets pro-inflammatoires de sa protéine d'enveloppe et de la voie d'activation engagée. Cet élément rétroviral (lui-même sous dépendance de co-facteurs d'activation) et ses effets associés sont tout à fait pertinents dans le cas de maladie démyélinisantes inflammatoires [21]. Dans le cas de la schizophrénie, une telle inflammation révélée au niveau systémique par la surexpression d'IL-6, est aussi pertinente, localement au niveau de la substance grise du cerveau, au regard des effets

25

30



neurotoxiques et excitotoxiques connus de l'inflammation médiée par les microgliocytes/macrophages du cerveau [22-36].

L'expression différentielle de séquences ARN  
5 MSRV/HERV-W a aussi été rapportée dans le tissu cortico-  
frontal de patients schizophrènes, et non chez des témoins  
incluant notamment des psychoses maniaco-dépressives (bipolar  
disorders) [37]. En outre, le reflet systémique de ce  
différentiel rétroviral « MSRV/HERV-W » a été mis en évidence  
10 dans le sang de jumeaux homozygotes discordants pour la  
pathologie schizophrénique, corroborant ainsi l'existence  
d'une réplique « systémique » pouvant jouer notamment un rôle  
dans l'hyperexpression d'IL-6 circulante précédemment  
rapportée [3].

15

Les effets de la protéine d'enveloppe de MSRV/HERV-W  
chez des patients schizophrènes ont leur place dans la cascade  
pathogénique de la schizophrénie, au niveau du rôle de  
facteurs inflammatoires spécifiques dans la genèse de signaux  
20 neurotoxiques et/ou excitotoxiques corticaux ou sub-corticaux.

Ainsi, la présente invention a pour objet une méthode  
pour traiter un individu présentant une pathologie associée à  
la présence de MSRV/HERV-W comprenant l'administration à  
25 l'individu d'une composition thérapeutique ou médicament  
comprenant au moins un anticorps choisi dans le groupe (i) des  
anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W capables de se lier  
spécifiquement (se liant spécifiquement) à la fraction soluble  
de la protéine Env de MSRV/HERV-W ou dans le groupe (ii) des  
30 anticorps capables de se lier spécifiquement (se liant  
spécifiquement) au récepteur TLR4 de la fraction soluble de la  
protéine Env-SU MSRV/HERV-W pour inhiber la cascade pro-  
inflammatoire induite par l'activation de MSRV/HERV-W, et un  
véhicule plus, si nécessaire un vecteur pharmaceutiquement

acceptable. Ladite méthode est en particulier utilisée pour le traitement de la SEP et la SCZ.

Selon la méthode de l'invention, on peut administrer  
5 au patient une composition ou médicament comprenant au moins un anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W et au moins un anticorps anti-TLR4.

De préférence, dans la méthode de l'invention,  
10 l'anticorps anti-Env-SU est choisi parmi les anticorps suivants : anticorps monoclonaux anti-Env-SU MSRV/HERV-W (anticorps 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10 (bioMérieux)) et l'anticorps anti-TLR4 est l'anticorps anti-TLR4 humaine HTA125 (commercialisé par la société eBioscience). Le mode  
15 d'obtention des anticorps monoclonaux bioMérieux est décrit dans la description qui suit. Les anticorps précités ont pour caractéristique originale, et jusqu'alors inconnue, d'être neutralisants vis à vis de l'activité pro-inflammatoire nouvellement mise en évidence sur les cellules présentatrices  
20 d'antigènes via le récepteur TLR4.

Les anticorps anti-TLR4 ou anti-Env-SU sont administrés à l'individu à l'aide d'un véhicule pharmacaceutiquement acceptable, associé si nécessaire à un  
25 vecteur pharmaceutiquement acceptable pour les véhiculer à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Si, comme c'est le cas pour la SEP, à un certain stade de l'évolution de la pathologie il y a ouverture de la barrière hémato-encéphalique il n'est pas nécessaire d'utiliser de tels vecteurs, mais  
30 quand il n'y a pas ouverture de la barrière hémato-encéphalique, ce qui est également le cas pour SCZ, de tels vecteurs sont nécessaires. Ces vecteurs sont bien connus [38-45]. La démarche thérapeutique cible une composante inflammatoire liée à l'activation des

microgliocytes/macrophages cérébraux, avec une spécificité unique dans ce domaine. Cette spécificité est liée à l'identification du système ligand-récepteur « Env-SU MSRV et TLR4 » impliqué dans la genèse des signaux inflammatoires précoces qui, par exemple, initient une cascade démyélinisante quand ils proviennent des microgliocytes/macrophages localisés dans la substance blanche (SEP), ou une cascade excitotoxique/neurotoxique quand ils sont produits par ces mêmes cellules dans la substance grise (SCZ).

10

L'utilité des anticorps anti-Env-SU MSRV et anti-TLR4 est de bloquer « à la source » la cascade pro-inflammatoire induite par la réactivation MSRV/HERV-W (elle même, induite par des co-facteurs infectieux de type herpesvirus, par des signaux hormonaux ou par des cytokines particulières, variables selon les pathologies) dans les différentes maladies associées à une expression pathologique MSRV/HERV-W.

Ainsi, la présente invention a pour objet une composition, étant entendu que cette composition est à visée thérapeutique, qui comprend au moins un anticorps choisi dans le groupe (i) des anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W ou dans le groupe (ii) des anticorps anti-TLR4 capables de se lier spécifiquement à la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W ou au récepteur TLR4 de la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W, et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Si nécessaire, ladite composition comprend également un vecteur pharmaceutiquement acceptable. De préférence, la composition comprend au moins un anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W et au moins un anticorps anti-TLR4. Les anticorps préférés dans cette composition sont les anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W (3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10) et l'anticorps anti-TLR4 HTA125. Les anticorps précités sont des anticorps monoclonaux « neutralisants » vis à vis de

l'activité pro-inflammatoire nouvellement mise en évidence sur les cellules présentatrices d'antigènes via le récepteur TLR4.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'au  
5 moins un anticorps choisi dans le groupe (i) des anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W ou dans le groupe (ii) des anticorps anti-TLR4 capables de se lier spécifiquement à la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W ou au récepteur TLR4 de la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W pour  
10 la préparation d'un médicament. En particulier, il est utilisé au moins un anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W et au moins d'un anticorps anti-TLR4. L'anticorps anti-Env-SU HERV-W est choisi parmi les anticorps 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10 et l'anticorps anti-TLR4 est l'anticorps HTA125. Cette utilisation est faite  
15 pour le traitement d'une pathologie associée à MSRV/HERV-W, telle que la sclérose en plaques et la schizophrénie.

L'invention a encore pour objet des anticorps choisi parmi les anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W et anti-TLR4  
20 capable de se lier spécifiquement (se liant spécifiquement) à la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W et au récepteur TLR4 de la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W pour inhiber la cascade pro-inflammatoire induite par l'activation de MSRV/HERV-W, en particulier les anticorps  
25 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10.

Le terme « anticorps » utilisé dans la présente invention inclut les anticorps monoclonaux, les anticorps chimères, les anticorps humanisés, les anticorps recombinants  
30 et les fragments desdits anticorps qui sont caractérisés par une affinité élevée pour la fraction soluble de la protéine d'enveloppe de MSRV/HERV-W et qui présentent aucune toxicité ou une très faible toxicité. En particulier, il est préférable d'utiliser un anticorps dont la région variable et/ou la

5 région constante est faiblement immunogène pour l'individu auquel il est administré. Les anticorps de la présente invention sont caractérisés par leur capacité à traiter des patients présentant des pathologies associées à MSRV/HERV-W tout en ne présentant aucune toxicité ou une très faible toxicité. La faible immunogénicité et/ou l'affinité élevée de ces anticorps peut contribuer aux résultats thérapeutiques atteints.

10 Par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)2, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par anticorps chimère on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps  
15 natif (voir par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397).

La production d'anticorps monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à  
20 titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 : 495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550. L'immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide KLH) comme support  
25 pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en  
30 utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits in vitro par culture cellulaire des hybridomes

produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quelque soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou la chromatographie d'affinité (protéine A ou G). Les anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour sélectionner les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps et d'anticorps chimères produits par génie génétique est bien connue de l'homme du métier.

Les formes « humanisées » d'anticorps non humains, par exemple murins, sont des anticorps chimères qui comprennent une séquence minimale dérivée d'une immunoglobuline non humaine. Pour la plupart, les anticorps humanisés sont des immunoglobulines humaines (anticorps récepteur) dans lesquelles des résidus d'une région hypervariable du récepteur sont remplacés par des résidus d'une région hypervariable d'une espèce donneur (anticorps donneur) non humaine, telle que souris, rat, lapin ou primate non humain, ayant la spécificité, l'affinité et la capacité souhaitées. Dans certains cas, les résidus (FR) de la région Fv de l'immunoglobuline humaine sont remplacés par des résidus correspondants non humains. De plus, les anticorps humanisés peuvent comprendre des résidus qui ne sont pas trouvés dans l'anticorps receveur ou dans l'anticorps donneur. Ces modifications peuvent être effectuées pour améliorer les performances de l'anticorps. En général, l'anticorps humanisé comprendra au moins un et de préférence deux domaines variables, dans lesquels tout ou à peu près tout des boucles hypervariables correspondent à une immunoglobuline non humaine et tout ou à peu près tout des régions FR seront celles d'une

immunoglobuline humaine. Les anticorps humanisés facultativement pourront aussi comprendre au moins une partie d'une région constante (Fc) d'une immunoglobuline, telle qu'une immunoglobuline humaine. En général, la région variable  
5 est dérivée d'un anticorps mammifère non humain et la région constante est dérivée d'une immunoglobuline humaine. De préférence, la région variable choisie présente une faible immunogénicité et est associée à une région constante qui présente également une faible immunogénicité.

10

Ces anticorps sont de préférence les anticorps « neutralisants » suivants :

- Anticorps monoclonaux anti-Env-SU MSRV/HERV-W : anticorps 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10 (bioMérieux),
- 15 - Anticorps anti-TLR4 : anticorps monoclonal anti-TLR4 humain HTA125 (commercialisé par la société eBioscience).

Les anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W sont produits selon les protocoles décrits ci-dessous.

20

- Production de l'anticorps 3B2H4 :

Les souris sont immunisées selon le protocole suivant : au jour JO, injection intrapéritonéale de 20  $\mu$ g d'immunogène, consistant en de la protéine recombinante purifiée Env/MSRV telles que décrite précédemment [11] en  
25 présence d'adjuvant de Freund complet. Aux jours J14 et J28 nouvelle injection intrapéritonéale de la même quantité d'immunogène en présence d'adjuvant de Freund incomplet. Quatre, trois et deux jours avant la fusion faire une  
30 injection intrapéritonéale de 100  $\mu$ g d'immunogène dilué en eau physiologique.

400 surnageants ont été criblés par technique d'ELISA indirect. Les plaques ont été « coatées » avec 100  $\mu$ l d'antigène à 1 $\mu$ g/ml en tampon bicarbonate 0.05M, pH 9.6. Les

plaques « coatées » ont été incubées une nuit à la température de 18-22°C. Les plaques ont été saturées avec 200 µl de PBS-lait 1% et soumises à incubation 1 heure à 37°+/-2°C. 100µl de surnageants ou de liquide d'ascites dilués en tampon PBS-Tween 20 0.05% ont été ajoutés et les plaques ont été incubées 1 heure à 37°+/-2°C. 100µl d'anticorps polyclonal de chèvre anti-Ig(H+L) de souris conjugué à la phosphatase alcaline (PAL) (Jackson ImmunoResearch réf:115-055-062), dilué en tampon PBS-BSA 1% au 1/2000 ont été ajoutés et les plaques ont ensuite été incubées 1 heure à 37°+/-2°C. 100µl de PNPP (Biomérieux réf 60002990) à la concentration de 2 mg/ml dans de la DEA-HCL (Biomérieux réf 60002989), pH=9,8 ont été ajoutés. Les plaques ont ensuite été soumises à incubation pendant 30 minutes à la température de 37°+/-2°C. La réaction a été bloquée par addition de 100 µl de NaOH, 1N. Trois lavages sont effectués entre chaque étape avec 300 µl de PBS-Tween 20, 0,05%. Un lavage supplémentaire en eau distillée est effectué avant d'ajouter le PNPP.

22 surnageants se sont révélés positifs en ELISA indirect avec une DO > à 0,2 correspondant à quatre fois le bruit de fond. Après les tests de spécificité un seul anticorps est produit.

- Production des anticorps 13H5A5 et 3H10F10 :

Les souris sont immunisées selon le protocole suivant : au jour JO, injection intrapéritonéale de 40 µg d'immunogène, consistant en de la protéine recombinante purifiée Env/MSRV telle que décrite [11], en présence d'adjuvant de Freund complet. Aux jours J14, J28 et J78 nouvelle injection intrapéritonéale de la même quantité d'immunogène en présence d'adjuvant de Freund incomplet. Quatre, trois et deux jours avant la fusion faire une injection intrapéritonéale de 50 µg d'immunogène dilué en eau physiologique.



1350 surnageants ont été criblés par technique d'ELISA indirect, comme décrit ci-dessus.

39 surnageants se sont révélés positifs en ELISA indirect avec une DO > à 0,4 correspondant à quatre fois le  
5 bruit de fond. Après les tests de spécificité deux anticorps sont produits.

Les anticorps anti-Env-SU et anti-TLR4 précités sont utilisés pour la préparation d'un médicament ou composition  
10 thérapeutique pour le traitement de pathologies associées à MSRV/HERV-W, comme décrit ci-dessus. Dans la composition à visée thérapeutique de la présente invention, l'anticorps ou ingrédient actif est associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement à un vecteur pharmaceutiquement  
15 acceptable. Les véhicules pharmaceutiquement acceptables sont déterminées et choisis en fonction du mode d'administration retenu et de la pratique standard dans le domaine pharmaceutique. Parce que les protéines sont soumises à digestion quand elles sont administrées par voie orale, une  
20 administration parentérale, telle qu'intraveineuse, sous cutanée ou intramusculaire devrait ordinairement être utilisée pour optimiser l'absorption. Les véhicules pharmaceutiquement acceptables sont décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co. Par  
25 exemple, une composition parentérale appropriée pour une administration par injection est préparée en dissolvant 1,5% en poids de l'ingrédient actif dans une solution de chlorure de sodium 0,9%. Il peut être nécessaire d'associer l'anticorps à un vecteur sélectionné qui permette le passage de  
30 l'anticorps au travers de la BHE. L'anticorps non-transportable peut ainsi être couplé à un vecteur transportable, tel que l'albumine cationisée, la transférine, l'insuline et le facteur de croissance insuline-like ou à un fragment desdites protéines. Il a notamment déjà été montré

que des anticorps monoclonaux non-transportables (IgG3), liés à un vecteur de transport, tel que la transferrine ou le facteur de croissance insuline-like, non seulement étaient capables de traverser la BHE, mais également que les propriétés fonctionnelles de ces anticorps étaient conservées. D'autres études ont déjà montré que des produits neuropharmaceutiques pouvaient être délivrés au niveau du cerveau par l'intermédiaire de liposomes. Cette approche est également importante car elle offre un mécanisme par lequel toute molécule qui peut être encapsulée dans un liposome peut être dirigée jusqu'au cerveau.

Les anticorps peuvent être administrés soit comme des agents thérapeutiques individuels, soit en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques pour accroître et améliorer le traitement. Le dosage dépendra bien sûr de facteurs connus, tels que les caractéristiques pharmacodynamiques de l'agent particulier et de sa voie d'administration, mais également de facteurs tels que l'âge, le poids, la fréquence du traitement et l'effet souhaité et attendu. Habituellement une dose journalière pour un ingrédient actif est comprise entre 0,01 à 100 milligrammes par kilogramme pour un être humain. Ordinairement, 1 à 40 milligrammes par kilogramme par jour, administrés en une ou plusieurs doses journalières, est une quantité efficace pour obtenir l'effet recherché.

### Figures.

La figure 1 représente les structures et les séquences an acides aminés d'ENV-pV14 et d'ENV-SU. La figure 1 (a) correspond aux structures de Env-Pv14 (la protéine d'enveloppe complète de MSRV) et de Env-SU (une fraction de 287 acides aminés représentant l'unité soluble extracellulaire clivée à la position K316 de la protéine complète ENV pV14. La figure 1

(b) représente les séquences en acides aminés de Env pV14 et de Env-SU, cette dernière étant indiquée en caractères gras et référencée dans l'identificateur de séquences en SEQ ID NO :1.

La masse moléculaire moyenne calculée de Env-SU est égale à 32061.59. Son pI estimé est égal à = 9.61. Sa composition en acides aminés est la suivante :

Acides aminés non-polaires:

		Nombre	Pourcentage
10	A	9	3,14
	V	16	5,57
	L	25	8,71
	I	13	4,53
	P	21	7,32
15	M	7	2,44
	F	11	3,83
	W	6	2,09

Acides aminés polaires:

		Nombre	Pourcentage
20	G	16	5,57
	S	31	10,80
	T	34	11,85
	C	12	4,18
25	Y	10	3,48
	N	18	6,27
	Q	9	3,14

Acides aminés acides:

		Nombre	Pourcentage
30	D	4	1,39
	E	10	3,48

## Acides aminés basiques :

	Nombre	Pourcentage
K	9	3,14
R	12	4,18
5 H	14	4,88

Figure 2: Env-SU induit la production de cytokines pro-inflammatoires dans des cultures de PBMCs (cellules mononucléées) humaines. La figure 2 A représente la sécrétion du TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6, analysée par test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) des surnageants de culture de PBMCs de donneurs sains, stimulés pendant 24 heures avec des doses croissantes d'Env-SU. Les résultats correspondent à trois expériences indépendantes. Les doses d'Env-SU sont représentées en abscisse (en  $\mu\text{g/ml}$ ). L'axe des ordonnées correspond aux quantités de cytokines (en  $\text{ng/ml}$ ). Dans les courbes, le symbole ■ correspond à la sécrétion d'IL-6, le symbole ● correspond à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et le symbole ▲ correspond à la sécrétion du TNF- $\alpha$ . Dans la figure 1 B, les PBMCs ont été stimulées avec 1  $\mu\text{g/ml}$  de contrôle autologue, d'Env-SU, de LPS ou de SEB et incubés pendant 24, 48 et 72 heures avant analyse de la sécrétion des cytokines par ELISA. Les axes des abscisses correspondent au temps en heures et les axes des ordonnées correspondent à la production de cytokines IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  en  $\text{ng/ml}$  pour IFN $\gamma$  et IL-6 (figures 1B (a) et 1B (c)) et en  $\text{pg/ml}$  pour TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (figures 1B (b) et 1 B (d)). Dans cette figure —●— correspond à Env-SU, -x- correspond au LPS, —▲— correspond au contrôle autologue et ..... correspond à SEB.

30

Figure 3 : Les activités stimulant les cytokines de Env-SU ne sont pas dues à une contamination par endotoxines. Les PBMCs ont été stimulées pendant 24 heures avec le contrôle

autologue (MOCK), Env-SU, LPS ou SEB. Quand ceci est indiqué, les cellules ont été traitées avec 10  $\mu\text{g/ml}$  de Polymixine B (PdyB) avant la stimulation (représenté en noir dans la figure). En parallèle, les cellules ont également été incubées avec des protéines et des toxines bouillies ( $100^\circ\text{C}$ ) pendant 30 minutes (représenté en gris dans la figure). Les surnageants de culture ont été récoltés et testés pour la libération du TNF- $\alpha$  par ELISA. Les résultats présentés dans cette figure correspondent à la moyenne de trois expériences. L'axe des ordonnées correspond aux quantités de TNF- $\alpha$  libéré, en pg/ml.

Figure 4 : L'anticorps monoclonal anti-Env-SU (13H5A5) bloque l'activité stimulant les cytokines de Env-SU. Les PBMCs ont été stimulées pendant 24 heures avec 1  $\mu\text{g/ml}$  du contrôle autologue CK2, Env-SU et LPS et pré-incubées ou non avec 30  $\mu\text{g/ml}$  d'anticorps monoclonal anti-Env-SU et d'anticorps monoclonal anti-Gag (3H1H6). Les surnageants de culture ont été récoltés et testés pour la sécrétion du TNF- $\alpha$ . Les résultats présentés dans cette figure correspondent à la moyenne de trois expériences. L'axe des ordonnées correspond aux quantités de TNF- $\alpha$  libéré, en pg/ml.

Figure 5 : Env-SU active directement les monocytes humains purifiés. Des monocytes humains ont été purifiés à partir de PBMCs humaines (pureté supérieure à 95%) et ensuite stimulés avec le contrôle autologue (Mock), Env-SU ou LPS, à une concentration de 1  $\mu\text{g/ml}$ , pendant 24 heures. La figure 5a représente l'expression des marqueurs d'activation CD80 (figure de gauche) et CD86 (figure de droite) analysée par cytométrie de flux. En abscisses est représenté le nombre de cellules comptées et en ordonnées l'intensité de fluorescence par cellule (« counts »). La résultante représente le nombre de cellules comptées pour chaque intensité de fluorescence. L'aire définie par les courbes représente le nombre de

cellules totales pour chaque condition testée. La répartition des cellules en fonction de l'intensité de fluorescence est montrée par l'allure de la courbe. L'aire blanche représente les résultats obtenus avec le contrôle témoin (Mock), l'aire grisée, contours traits fins, représente les résultats obtenus avec Env-SU et l'aire grisée, contours très épais, représente les résultats obtenus avec le LPS. La figure 5b représente les sécrétions de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-12p40, analysées par ELISA. En blanc sont représentés les résultats obtenus après stimulation par le contrôle autologue. Les résultats obtenus après stimulation par ENV-SU et LPS sont respectivement représentés en noir et gris. L'axe des ordonnées correspond aux quantités de cytokines sécrétées, en ng/ml. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences.

Figure 6 : Env-SU active les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC). Les MDDC ont été générées à partir de monocytes purifiés et ensuite stimulées avec le contrôle autologue, Env-SU, ou LPS, à une concentration de 1  $\mu$ g/ml, pendant 24 heures. La figure 6a représente l'expression des marqueurs d'activation CD80, CD86, CD40 et HLA-DR, analysée par cytométrie de flux. En abscisses est représenté le nombre de cellules comptées et en ordonnées l'intensité de fluorescence par cellule (« counts »). L'image supérieure gauche représente l'analyse du CD80, l'image supérieure droite celle du CD86, l'image inférieure gauche représente celle du CD40 et l'image inférieure droite celle du HLA-DR. La résultante représente le nombre de cellules comptées pour chaque intensité de fluorescence. L'aire définie par les courbes représente le nombre de cellules totales pour chaque condition testée. La répartition des cellules en fonction de l'intensité de fluorescence est montrée par l'allure de la courbe. L'aire blanche de gauche représente les résultats obtenus avec le contrôle témoin (Mock), l'aire blanche de

droite, contours traits plus épais, représente les résultats obtenus avec Env-SU et l'aire grisée représente les résultats obtenus avec le LPS. La figure 6b représente la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40 et IL-12p70, analysée par ELISA, dans les surnageants de culture. L'axe des ordonnées correspond aux quantités de cytokines sécrétée, en ng/ml. Dans les histogrammes représentés à la figure 6b, Mock correspond aux résultats obtenus après stimulation avec le contrôle autologue, Env-SU (en noir) correspond aux résultats obtenus après stimulation avec Env-SU et LPS (en gris) correspond aux résultats obtenus après stimulation avec LPS. La figure 6c représente la prolifération allogénique des cellules T par les cellules dendritiques préalablement stimulées par : Env-SU —■—, LPS --▲--, contrôle CK2 —●—. L'axe des abscisse représente le nombre de cellules dendritiques (respectivement 0, 1000, 5000 et 10 000). L'axe des ordonnées représente le nombre de coups par minute émis par les cellules ayant incorporées  $^3\text{H}$ -Thymidine.

Figure 7 : CD14 et TLR4 sont impliqués dans les propriétés pro-inflammatoires de Env-SU. Les PBMCs ont été pré-incubées pendant une heure avec ou sans anticorps neutralisants anti-CD14 (rhCD14, réf. : AB383, R&D Systems - UK) (figure 7a) et anti-TLR4 (figure 7b), à une concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$  et 5  $\mu\text{g/ml}$ . Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 24 heures avec le contrôle CK2, Env-SU(ENV1), LPS et SEB, à une concentration de 1  $\mu\text{g/ml}$ . La libération de TNF- $\alpha$  a été analysée, dans les surnageants de culture par ELISA. Les résultats sont montrés dans les histogrammes des figures 7a et 7b. L'axe des ordonnées correspond à la quantité de TNF- $\alpha$  libéré, en ng/ml. Les histogrammes en noir correspondent aux résultats obtenus sans ajout d'anticorps, les histogrammes en blanc correspondent aux résultats obtenus en présence d'anticorps anti-CD14 et anti-TLR4, à 20  $\mu\text{g/ml}$  et les

histogrammes en gris correspondent aux résultats obtenus en présence d'anticorps anti-CD14 et anti-TLR4, à 5 µg/ml. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expériences.

## 5 Matériels et méthodes

### Protéines et toxines.

La protéine de surface de l'enveloppe de MSRV (Env-SU) correspond à une séquence protéique de 287 acides aminés de la protéine totale d'enveloppe (Env Pv14, GenBank AF331500). Les structures et les séquences en acides aminés d'Env Pv14 et d'Env-SU sont respectivement représentées dans les figures 1 (a) et 1 (b). La protéine Env-SU de MSRV recombinante est exprimée dans *E.coli* et purifiée sur colonne FPLC. La qualité et la pureté de la protéine sont confirmées par spectrométrie de masse et Western Blot. La caséine kinase est utilisée comme contrôle négatif autologue. Cette protéine de contrôle a été produite et purifiée dans les mêmes conditions que Env-SU.

Les deux protéines sont testées pour la présence d'endotoxines par un test sur Lysat d'Amebocyte de *Limulus* (LAL) réalisé par la société CleanCells (Bouffere, France). Toutes les fractions sont en dessous du seuil de détection de 5 UI/ml. L'entérotoxine B de staphylocoque (SEB) obtenue chez Toxin Technology (Sarasota, FL, USA) était pure à 95%. Le liposaccharide (LPS) de *E. coli* souche 026:B6 est obtenu chez Sigma Aldrich.

### Milieu de culture.

Le milieu de culture est le milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté en :

L-glutamine 1% (Sigma-Aldrich),  
pénicilline / streptomycine 1% (Sigma-Aldrich),  
pyruvate de sodium 1% (Sigma-Aldrich),



acides aminés non essentiels 1% (Sigma-Aldrich),  
et

SVF (sérum de veau foetal) inactivé par la  
chaleur 10% (BioWest).

5 Pour les essais de prolifération des cellules T,  
un sérum AB humain (Sigma-Aldrich) a été utilisé au lieu  
du SVF.

#### Isolement des cellules et préparation.

10 Des cellules mononucléées humaines du sang  
périphérique (PBMCs) sont isolées à partir de donneurs sains  
par centrifugation par gradient de densité sur Ficoll Paque.  
Les monocytes des PBMCs sont purifiés par enlèvement des  
cellules T, des cellules B, des cellules dendritiques, des  
15 cellules NK et des basophiles en utilisant le kit d'isolement  
des monocytes, commercialisé par la société Miltenyi Biotec.  
En résumé, les PBMCs sont d'abord incubées avec un cocktail  
d'anticorps monoclonaux et d'anti-immunoglobuline humaine  
conjugués à un haptène et marqués magnétiquement (anti-CD3,  
20 anti-CD7, anti-CD19, anti-CD45RA, anti-CD56 et anti-IgE), puis  
avec des micro-billes (MACs MicroBeads) couplées à des  
anticorps monoclonaux anti-haptène. Les cellules marquées  
magnétiquement sont finalement enlevées en les retenant sur  
une colonne dans un champ magnétique. La pureté de la  
25 population des monocytes récupérée est toujours supérieure à  
95%, comme déterminé par l'expression de CD14 par analyse par  
cytométrie de flux. Pour la génération de monocytes dérivés  
des cellules dendritiques (MDDCs), les monocytes purifiés sont  
cultivés pendant 5 jours sur des plaques de 6 puits contenant  
30 de l'IL-4 à 25 ng/ml et du GM-CSF à 50 ng/ml dans 2 ml du  
milieu de culture. Au jour J3 de la culture, la quantité  
complète de cytokines est ajoutée aux cellules. Comme montré  
par analyse de la morphologie et par cytométrie de flux, la

préparation de cellules résultante contient plus de 90% de cellules dendritiques CD1a positives.

#### Stimulation cellulaire.

5 Les cellules (PBMCs, monocytes ou MDDCs) sont placées dans des plaques de 24 puits, à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules par puits, dans 1 ml de milieu de culture avant stimulation par Env-SU, LPS, SEB, ou le contrôle autologue. Elles sont ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère  
10 humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Quand indiqué, les cellules ont été pré-incubées soit avec 10 µg/ml de Polymyxine B (Sigma-Aldrich), 20 µg/ml et 5 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-CD14, 20 µg/ml et 5 µg/ml d'anticorps anti-TLR-4 (HTA125, eBioscience) ou avec une IgG de contrôle d'isotype 2a (IgG2a)  
15 (eBM2a, eBioscience) avant la stimulation cellulaire. Dans certaines expériences, Env-SU, le contrôle autologue, LPS et SEB sont bouillis pendant 30 minutes avant le traitement cellulaire.

Pour déterminer la spécificité des résultats, 1 µg de  
20 ENV-SU, LPS, SEB et du contrôle autologue est pré-incubé à 4°C pendant 1 heure avec 30 µg/ml d'anticorps monoclonaux dirigés soit contre ENV-SU (13H5A5 ; IgG1 ; biomérieux) soit contre GAG (3H1H6 ; IgG1 ; biomérieux).

Ensuite, les cellules sont incubées 24 heures à 37°C,  
25 puis les surnageants de culture sont récoltés pour l'analyse de la sécrétion de TNF-α, IL-1β et IL-6 par ELISA.

#### Essais de prolifération des cellules T.

Les monocytes et les MDDCs stimulés sont utilisés  
30 comme stimulateurs des cellules T. Les cellules T allogéniques sont utilisées à  $1 \times 10^5$  cellules par puits comme cellules « répondeuses » dans des microplaques de 96 puits à fond rond. Les cellules stimulatrices sont ajoutées aux cellules T dans des doses croissantes et les cultures sont effectuées en

triple dans un volume final de 200  $\mu$ l de milieu de culture. Après 5 jours d'incubation à 37°C, la prolifération des cellules T est évaluée par mesure de la radioactivité incorporée. Pour ce faire, dans les dernières 18 heures d'incubation, 1  $\mu$ Ci de  $^3$ H Thymidine est ajouté à chaque puits. Les cellules sont ensuite récupérées sur des tapis de filtre de verre pour la mesure de la radioactivité incorporée.

10 Marquages par immunofluorescence et cytométrie de flux.

Les cellules sont récoltées, lavées dans du PBS et ensuite colorées pour des marqueurs de surface différents. Les anticorps monoclonaux suivants (Becton-Dickinson, San Jose, CA) ont été utilisés : anti-CD1a allophycocyanine (HI149-APC), 15 anti-CD14 isothiocyanate de fluoresceine (MOP9-FITC), CD40 phycoerythrine (5C3-PE), CD80 phycoerythrine (L307.4-PE), CD86 phycoerythrine (IT2.2-PE) et HLA-DR chlorophylle de peridine (L243-PerCP).

La coloration par immunofluorescence directe des 20 cellules est réalisée dans du PBS refroidi sur glace supplémenté par du SVF 2%, avec les différents anticorps aux concentrations recommandées par les fabricants. Après 30 minutes à 4°C, les cellules sont lavées et ensuite analysées en utilisant un FACS Calibur (nom commercial) et le logiciel 25 CellQuest (nom commercial) (Becton Dickinson).

#### Essais de production des cytokines.

Les surnageants de cultures sont collectés et conservés à -20°C avant analyse de la sécrétion des cytokines. 30 Les quantités de cytokines sont mesurées en utilisant les kits ELISA OptEIA (nom commercial) (Pharmigen) pour IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p40 and TNF-alpha, en respectant les instructions du fabricant.

### Résultats.

Env-SU induit la production de cytokines pro-inflammatoires à partir de PBMCs humaines.

5 La capacité de la protéine recombinante Env-SU à stimuler la sécrétion de cytokines dans les cultures de PBMCs a été testée. Les PBMCs de donneurs sains ont été incubées pendant 24 heures avec des doses croissantes de la protéine recombinante Env-SU et la sécrétion des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  10 et IL-6 a été évaluée par ELISA. Les quantités de cytokines sécrétées ont été comparées avec celles obtenues avec le contrôle autologue, SEB (un superantigène bactérien bien caractérisé) et LPS, bien connu pour avoir des propriétés pro-inflammatoires sur les PBMCs humaines. Toutes les protéines et 15 les toxines ont été utilisées à une concentration de 1  $\mu$ g/ml (concentration optimale pour l'induction de cytokines pro-inflammatoires déterminée par des expériences dose/réponse). Les résultats montrent que Env-SU induit la sécrétion des trois cytokines d'une manière dépendante de la dose, même à 20 des doses aussi faibles que 10 ng/ml. Comme montré dans la figure 2, la cinétique de sécrétion de cytokines obtenue avec Env-SU est plus proche de celle du LPS que du SEB. En effet, Env-SU et LPS sont capables d'induire la sécrétion de grandes quantités de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  dès 24 heures, alors que 25 SEB induit seulement la sécrétion de TNF- $\alpha$  même après 72 heures d'incubation. Il est intéressant de noter que Env-SU et LPS atteignent leur pic de sécrétion de TNF- $\alpha$  tandis que SEB induit une sécrétion constante de TNF- $\alpha$ . Par rapport à IL-1 $\beta$ , Env-SU et LPS induisent un profil de sécrétion similaire à 30 celui du TNF- $\alpha$ , caractérisé par un pic de sécrétion autour de 24 heures d'incubation suivi d'une diminution constante. SEB qui est connu pour activer une grande population de lymphocytes T portant la même spécificité TCR V $\beta$  n'induit aucun

IL-1 $\beta$ . IL-6 est sécrété de manière constante par les PBMCs stimulées par Env-SU et LPS, mais non par SEB. IL-6 et IL-1 $\beta$  sont deux cytokines préférentiellement relarguées par les monocytes/macrophages activés, bien que ces types de cellules  
5 potentiellement sécrètent du TNF- $\alpha$ . Ces données montrent que d'une manière similaire à celle de LPS, Env-SU cible les cellules du système immunitaire inné, telles que les monocytes et les macrophages pour la libération de cytokines pro-inflammatoires.

10

Pour éliminer la possibilité d'une contamination par endotoxines de la protéine recombinante Env-SU, les PBMCs humaines ont été soit traitées avec un inhibiteur des LPS, la Polymixine B (PB) avant stimulation, soit incubées avec des  
15 protéines et des toxines bouillies. En parallèle, a également été ajouté un contrôle autologue produit et purifié dans les mêmes conditions, avec les mêmes réactifs et matériel : caséine kinase humaine CK2.

20 Après 24 heures d'incubation, les surnageants de culture ont été récoltés et analysés pour la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Comme montré à la figure 4, le TNF- $\alpha$  induit par Env-SU et SEB est seulement partiellement inhibé par PB, alors que les effets de LPS sont totalement abolis. La protéine autologue de  
25 contrôle n'induit aucune sécrétion de cytokines. La libération du TNF- $\alpha$  est également inhibée de manière significative quand les protéines Env-SU sont bouillies pendant 30 minutes, alors que l'activité LPS n'est pas affectée. Ceci est conforme aux résultats négatifs obtenus lors de l'analyse de contrôle de  
30 qualité réalisée à la fois sur des échantillons purifiés de Env-SU et du contrôle autologue en utilisant le test LAL, approuvé par la Food and Drug Administration.

Ces résultats démontrent que les effets pro-inflammatoires observés précocement ne sont pas dûs à une contamination par endotoxines et que composant responsable de ces effets est bien une protéine.

5

Pour confirmer la spécificité des propriétés pro-inflammatoires de Env-SU, les effets d'anticorps monoclonaux ont été étudiés. Les PBMCs ont été incubées pendant 24 heures avec le contrôle autologue, Env-Su ou LPS pré-incubés à 4°C pendant 1 heure avec soit un anticorps monoclonal dirigé contre Env-SU, soit avec un anticorps monoclonal dirigé contre Gag. La protéine Gag utilisée pour développer cet anticorps monoclonal ne présente pas d'activité pro-inflammatoire et constitue un contrôle adéquat. Comme montré à la figure 4, l'anticorps monoclonal anti-Env-SU bloque spécifiquement la sécrétion de TNF- $\alpha$  médiée par Env-SU, mais pas celle de LPS. La sécrétion de cytokines n'est pas affectée par l'anticorps monoclonal anti-Gag. Ces résultats démontrent la spécificité de Env-SU sur l'induction de cytokines et l'activation cellulaire.

20

Env-SU a la capacité d'induire des cytokines pro-inflammatoires dans des cultures de PBMCs. Il a ensuite été vérifié que Env-SU était capable d'activer directement des monocytes purifiés. Les monocytes purifiés ont été stimulés avec le contrôle autologue, Env-SU ou LPS pendant 24 heures et différents marqueurs d'activation, tels que CD80 et CD86, ont été évalués par cytométrie de flux. Comparé au contrôle autologue, Env-SU induit une régulation en amont des deux marqueurs et les niveaux d'expression obtenus sont similaires à ceux de LPS (figure 5a). De grandes quantités de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-12p40 sont produites en réponse à Env-SU (figure 5b). Ces résultats montrent que Env-SU induit une

25

30

activation rapide et directe des monocytes associée à une production de cytokines pro-inflammatoires.

Les cellules dendritiques sont des cellules  
5 présentatrices d'antigènes liant les immunités innée et  
adaptative avec la capacité unique de contrôler l'activation  
des cellules T naïves. La capacité de Env-SU à activer  
directement des cellules dendritiques dérivées de monocytes  
(MDDCs) a été étudiée. Les cellules dendritiques ont été  
10 générées *in vitro* à partir de monocytes hautement purifiés et  
stimulées pendant 24 heures avec le contrôle autologue, Env-SU  
ou LPS. Env-SU est capable d'augmenter drastiquement  
l'activation des marqueurs CD80, CD86, CD40 et HLA-DR (figure  
6a). Les cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p40 et  
15 IL12p70 sont sécrétées à des niveaux plus élevés. Il est  
montré que les MDDCs stimulées par Env-SU sont capables  
d'induire une prolifération allogénique des cellules T à un  
degré plus important que le contrôle autologue, même quand le  
nombre de cellules stimulatrices est faible (figure 6c). Donc,  
20 de manière similaire au LPS (contrôle positif), Env-SU est  
capable d'induire la maturation de cellules dendritiques  
sécrétant de l'IL-12 et est donc capable d'induire des  
réponses immunes spécifiques primaires.

25 Pour déterminer si Env-SU utilise la même voie  
d'activation que LPS, les niveaux de TNF- $\alpha$ , sécrété par des  
PBMCs humaines après stimulation, avec ou sans pré-incubation  
avec des anticorps neutralisants anti-CD14 ou anti-TLR4 ont  
été mesurés. Les résultats présentés à la figure 7a montrent  
30 que le blocage de CD14 a pour résultat une inhibition  
significative dépendante de la dose d'Env-SU et de la  
sécrétion du TNF- $\alpha$  médiée par LPS (83% et 56% d'inhibition  
respectively avec 20  $\mu$ g d'anticorps anti-CD14). SEB, qui est  
connu pour activer les cellules T et les cellules

présentatrices d'antigènes via le récepteur des cellules T et le HLA-DR, n'est pas inhibé. Le blocage de TLR4 a pour résultat une inhibition de 37% sur les effets de Env-SU et une inhibition de 43% sur les effets de LPS, avec 20  $\mu$ g d'anticorps anti-TLR4 (figure 7b). Aucun effet d'inhibition est observé pour les anticorps de contrôle dans les deux expériences. Les récepteurs CD14 et TLR4 sont donc impliqués dans les propriétés pro-inflammatoires médiées par Env-SU.

10 En conclusion, la fraction soluble de la protéine d'enveloppe de MSRV/HERV-W stimule une réponse immunitaire innée via les récepteurs de reconnaissance CD14 et TLR4 et il est montré dans la présente invention que la cascade immunopathologique conduisant à des lésions inflammatoires  
15 peut être bloquée à un stade très précoce par administration d'une composition thérapeutique ou médicament comprenant au moins un anticorps choisi parmi les anticorps anti-Env-SU et anti-TLR4.



## Références bibliographiques

1. Conrad, B., R.N. Weissmahr, J. Boni, R. Arcari, J. Schupbach, and B. Mach, *A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes*. Cell, 1997. 90(2): p. 303-13.
2. Perron, H., J.A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P.W. Tuke, C. Voisset, J.L. Blond, B. Lalande, J.M. Seigneurin, and B. Mandrand, *Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. 94(14): p. 7583-8.
3. Deb-Rinker, P., T.A. Klempan, R.L. O'Reilly, E.F. Torrey, and S.M. Singh, *Molecular characterization of a MSRV-like sequence identified by RDA from monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia*. Genomics, 1999. 61(2): p. 133-44.
4. Perron, H., B. Lalande, B. Gratacap, A. Laurent, O. Genoulaz, C. Geny, M. Mallaret, E. Schuller, P. Stoebner, and J.M. Seigneurin, *Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis [letter]*. Lancet, 1991. 337(8745): p. 862-3.
5. Blond, J.L., F. Beseme, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, H. Perron, B. Mandrand, and F. Mallet, *Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family*. J Virol, 1999. 73(2): p. 1175-85.
6. Perron, H., J.P. Perin, F. Rieger, and P.M. Alliel, *Particle-associated retroviral RNA and tandem RGH/HERV-W copies on human chromosome 7q: possible components of a 'chain-reaction' triggered by infectious agents in multiple sclerosis?* J Neurovirol, 2000. 6(Suppl 2): p. S67-75.

7. Dolei, A., C. Serra, G. Mameli, M. Pugliatti, G. Sechi, M.C. Cirotto, G. Rosati, and S. Sotgiu, *Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients*. *Neurology*, 2002. 58(3): p. 471-3.
- 5 8. Garson, J.A., P.W. Tuke, P. Giraud, G. Paranhos-Baccala, and H. Perron, *Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis [letter] [see comments]*. *Lancet*, 1998. 351(9095): p. 33.
9. Olsson, P., B. Ryberg, R. Awad, S. Ammoun, H. Yin, S. Hjalmarsson, and J. Blomberg, *Retroviral RNA related to ERV9/MSRV in a human serum: a new sequence variant*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. 15(6): p. 591-3.
- 10 10. Sotgiu, S., C. Serra, G. Mameli, M. Pugliatti, G. Rosati, G. Arru, and A. Dolei, *Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study*. *Neurology*, 2002. 59(7): p. 1071-3.
- 15 11. Perron, H., E. Jouvin-Marche, M. Michel, A. Ounanian-Paraz, S. Camelo, A. Dumon, C. Jolivet-Reynaud, F. Marcel, Y. Souillet, E. Borel, L. Gebuhrer, L. Santoro, S. Marcel, J.M. Seigneurin, P.N. Marche, and M. Lafon, *Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation*. *Virology*, 2001. 287(2): p. 321-32.
- 20 12. Firouzi, R., R. A., M. Michel, J.-M. E., J.J. Hauw, C. Malcus-vocanson, F. Lazarini, L. Gebhurer, J.M. Seigneurin, J. Touraine, K. Sanhadji, P. Marche, and H. Perron, *Multiple Sclerosis Associated Retrovirus Particles Cause T-Lymphocyte Dependent Death with Brain Hemorrhage, in Humanized SCID Mice Model*. *Journal of Neurovirology*, 2003. 9: p. 79-93.
- 25 30 13. Kleine, T.O., P. Zwerenz, C. Graser, and P. Zofel, *Approach to discriminate subgroups in multiple sclerosis with cerebrospinal fluid (CSF) basic inflammation indices*

- and TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-8. *Brain Res Bull*, 2003. 61(3): p. 327-46.
14. Aarli, J.A., *Role of cytokines in neurological disorders*. *Curr Med Chem*, 2003. 10(19): p. 1931-7.
- 5 15. Miljkovic, D., J. Drulovic, V. Trajkovic, S. Mesaros, I. Dujmovic, D. Maksimovic, T. Samardzic, N. Stojasavljevic, Z. Levic, and M. Mostarica Stojkovic, *Nitric oxide metabolites and interleukin-6 in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients*. *Eur J Neurol*, 2002. 9(4): p. 413-8.
- 10 16. Fedetz, M., F. Matesanz, M. Pascual, J. Martin, O. Fernandez, M. Guerrero, and A. Alcina, *The -174/-597 promoter polymorphisms in the interleukin-6 gene are not associated with susceptibility to multiple sclerosis*. *J Neurol Sci*, 2001. 190(1-2): p. 69-72.
- 15 17. Vandebroek, K., P. Fiten, I. Ronsse, A. Goris, I. Porru, C. Melis, M. Rolesu, A. Billiau, M.G. Marrosu, and G. Opdenakker, *High-resolution analysis of IL-6 minisatellite polymorphism in Sardinian multiple sclerosis: effect on course and onset of disease*. *Genes Immun*, 2000. 1(7): p. 460-3.
- 20 18. Stelmasiak, Z., M. Koziol-Montewka, B. Dobosz, K. Rejdak, H. Bartosik-Psujek, K. Mitosek-Szewczyk, and E. Belniak-Legiec, *Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients*. *Med Sci Monit*, 2000. 6(6): p. 1104-8.
- 25 19. Lin, A., G. Kenis, S. Bignotti, G.J. Tura, R. De Jong, E. Bosmans, R. Pioli, C. Altamura, S. Scharpe, and M. Maes, *The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6*. *Schizophr Res*, 1998. 32(1): p. 9-15.
- 30 20. Karlsson, H., S. Bachmann, J. Schroder, J. McArthur, E.F. Torrey, and R.H. Yolken, *Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with*

- schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(8): p. 4634-9.
21. Perron, H., *Microbial Agents triggering Endogenous Retroviruses within Genetic Susceptibility Loci, Resulting in Expression of Superantigen and Gliotoxic Molecules: a Plausible " Immunovirogenetic " Cascade causing Multiple Sclerosis ?* Modern Aspects of Immunobiology, 2001. 1(5): p. 198-203.
22. Liu, Y., L. Qin, G. Li, W. Zhang, L. An, B. Liu, and J.S. Hong, *Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. 305(1): p. 212-8.
23. Morimoto, K., T. Murasugi, and T. Oda, *Acute neuroinflammation exacerbates excitotoxicity in rat hippocampus in vivo*. Exp Neurol, 2002. 177(1): p. 95-104.
24. Guillemin, G.J. and B.J. Brew, *Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease*. Redox Rep, 2002. 7(4): p. 199-206.
25. Kim, W.G., R.P. Mohny, B. Wilson, G.H. Jeohn, B. Liu, and J.S. Hong, *Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia*. J Neurosci, 2000. 20(16): p. 6309-16.
26. Licinio, J. and M.L. Wong, *The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress-responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection*. Mol Psychiatry, 1999. 4(4): p. 317-27.
27. Cotter, R.L., W.J. Burke, V.S. Thomas, J.F. Potter, J. Zheng, and H.E. Gendelman, *Insights into the neurodegenerative process of Alzheimer's disease: a role for mononuclear phagocyte-associated inflammation and neurotoxicity*. J Leukoc Biol, 1999. 65(4): p. 416-27.

28. Heese, K., C. Hock, and U. Otten, *Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells*. J Neurochem, 1998. 70(2): p. 699-707.
29. Chao, C.C., S. Hu, L. Ehrlich, and P.K. Peterson, *Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors*. Brain Behav Immun, 1995. 9(4): p. 355-65.
30. Chao, C.C. and S. Hu, *Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures*. Dev Neurosci, 1994. 16(3-4): p. 172-9.
31. Bal-Price, A. and G.C. Brown, *Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity*. J Neurosci, 2001. 21(17): p. 6480-91.
32. Obrenovitch, T.P., *Quinolinic acid accumulation during neuroinflammation. Does it imply excitotoxicity?* Ann N Y Acad Sci, 2001. 939(1-10).
33. Werner, P., D. Pitt, and C.S. Raine, *Glutamate excitotoxicity--a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis?* J Neural Transm Suppl, 2000(60): p. 375-85.
34. Pitt, D., P. Werner, and C.S. Raine, *Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis*. Nat Med, 2000. 6(1): p. 67-70.
35. Carlson, N.G., W.A. Wieggl, J. Chen, A. Bacchi, S.W. Rogers, and L.C. Gahring, *Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways*. J Immunol, 1999. 163(7): p. 3963-8.
36. Wang, Y.S. and T.D. White, *The bacterial endotoxin lipopolysaccharide causes rapid inappropriate excitation in rat cortex*. J Neurochem, 1999. 72(2): p. 652-60

37. Yolken, R.H., H. Karlsson, F. Yee, N.L. Johnston-Wilson, and E.F. Torrey, *Endogenous retroviruses and schizophrenia*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. 31(2-3): p. 193-9.
- 5 38. Cornford, E.M. and M.E. Cornford, *New systems for delivery of drugs to the brain in neurological disease*. Lancet Neurol, 2002. 1(5): p. 306-15.
39. Schmidt, J., J.M. Metselaar, M.H. Wauben, K.V. Toyka, G. Storm, and R. Gold, *Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis*. Brain, 2003. 126(Pt 8): p. 1895-904.
- 10 40. Pardridge, W.M., *Blood-brain barrier drug targeting enables neuroprotection in brain ischemia following delayed intravenous administration of neurotrophins*. Adv Exp Med Biol, 2002. 513(397-430.).
- 15 41. Watanabe, S., S. Sato, S. Nagase, K. Shimosato, and S. Ohkuma, *Chemotherapeutic targeting of etoposide to regions of the brain on the basis of polyamine level*. J Drug Target, 2002. 10(6): p. 457-61.
- 20 42. Scherrmann, J.M., *Drug delivery to brain via the blood-brain barrier*. Vascu Pharmacol, 2002. 38(6): p. 349-54.
43. Wang, J.X., X. Sun, and Z.R. Zhang, *Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles*. Eur J Pharm Biopharm, 2002. 54(3): p. 285-90. 16: Mahar Doan KM et al. Passive permeability and P-gl...[PMID: 12438524]Related Articles, Links.
- 25 44. Hosoya, K., S. Ohtsuki, and T. Terasaki, *Recent advances in the brain-to-blood efflux transport across the blood-brain barrier*. Int J Pharm, 2002. 248(1-2): p. 15-29.
- 30 45. Mora, M., M.L. Sagrista, D. Trombetta, F.P. Bonina, A. De Pasquale, and A. Saija, *Design and characterization of liposomes containing long-chain N-acylPEs for brain*

*delivery: penetration of liposomes incorporating GM1 into the rat brain. Pharm Res, 2002. 19(10): p. 1430-8.*

## REVENDICATIONS

1. Composition, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins  
5 un anticorps choisi dans le groupe (i) des anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W ou dans le groupe (ii) des anticorps anti-TLR4 capables de se lier spécifiquement à la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W ou au récepteur TLR4 de la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W, et un  
10 véhicule pharmaceutiquement acceptable.
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur pharmaceutiquement acceptable.
- 15 3. Composition selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W du groupe (i) et au moins un anticorps anti-TLR4 du groupe (ii).
- 20 4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'anticorps anti-Env-SU HERV-W du groupe (i) est choisi parmi les anticorps 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10 et l'anticorps anti-TLR4 du groupe (ii) est l'anticorps HTA125.
- 25 5. Utilisation d'au moins un anticorps choisi dans le groupe (i) des anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W ou dans le groupe (ii) des anticorps anti-TLR4 capables de se lier spécifiquement à la fraction soluble de la protéine Env de  
30 MSRV/HERV-W ou au récepteur TLR4 de la fraction soluble de la protéine Env de MSRV/HERV-W pour la préparation d'un médicament.



6. Utilisation selon la revendication 5 d'au moins un anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W du groupe (i) et d'au moins d'un anticorps anti-TLR4 du groupe (ii).
- 5 7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 5 à 6, dans laquelle l'anticorps anti-Env-SU HERV-W du groupe (i) est choisi parmi les anticorps 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10 et l'anticorps anti-TLR4 du groupe (ii) est l'anticorps HTA125.
- 10 8. Utilisation selon la revendication 7, pour le traitement d'une pathologie associée à MSRV/HERV-W.
9. Utilisation selon la revendication 7, dans laquelle la pathologie est la sclérose en plaques ou la schizophrénie.
- 15 10. Anticorps choisi parmi les anticorps 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10.

6. Utilisation selon la revendication 5 d'au moins un anticorps anti-Env-SU MSRV/HERV-W du groupe (i) et d'au moins d'un anticorps anti-TLR4 du groupe (ii).

5 7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 5 à 6, dans laquelle l'anticorps anti-Env-SU HERV-W du groupe (i) est choisi parmi les anticorps 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10 et l'anticorps anti-TLR4 du groupe (ii) est l'anticorps HTA125.

10 8. Utilisation selon la revendication 7, pour le traitement d'une pathologie associée à MSRV/HERV-W.

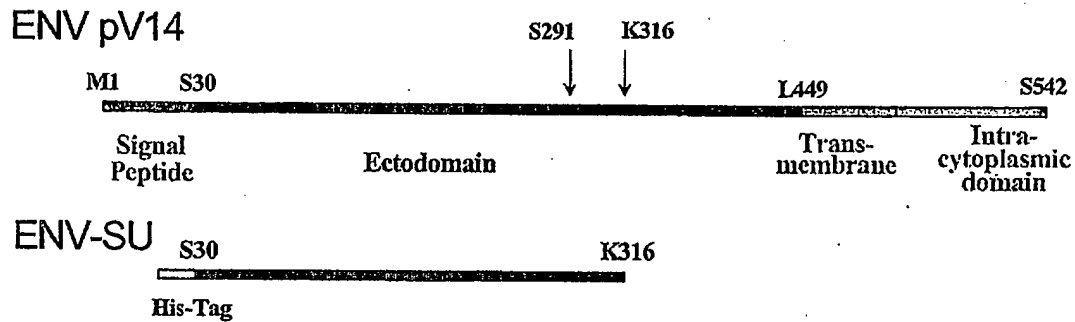
9. Utilisation selon la revendication 8, dans laquelle la pathologie est la sclérose en plaques ou la schizophrénie.

15

10. Anticorps choisi parmi les anticorps 3B2H4, 13H5A5 et 3H10F10.

Figure 1

a

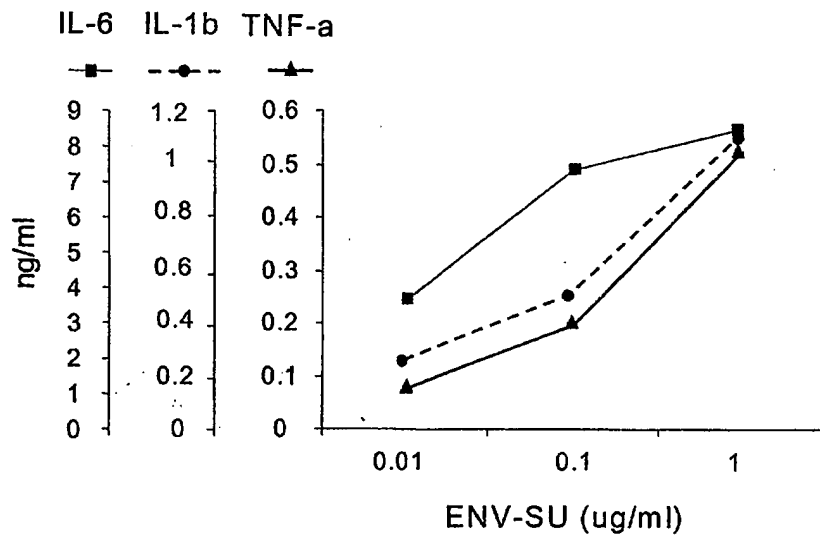


b

MALPYHTFLFIVLPPFALTAPPCCCTSSSPYQEFLLWRTRLPGNIDAPSYRSLSKGNSTFTAHTHMPRNCYN  
 SATLCMBHANTHYWTGKMINPSCPGGLGATVCWTFHTHTSMSDGGGIQQAAREKQVKEAISQLTRGHSTP  
 SPYKGLVLSKLHETLRTHTRLVSLFNTTLTRLHEVSAQNPTNCWMCLPLHFRPYISIPVPEQWNNESTEINT  
 TSVLVGPLVSNLEITHTSNLTVCVKSNTIDTTSSQCIRWVTPPTRIVCLPSGIFVCGTSAYHCLNGSSESMCF  
 S291↓  
 K316↓  
 LSFLVPPMTIYTEQDLYNHVVPKPHNKRVPILPFVIRAGVLGRLGTGIGSITTSTQFYKLSQEINGDMEQVTDLS  
 VTLQDQLNSLAAVVLQNRALDLLTAKRGGTCLFLGEERCYYVNSRIVTEKVKEIRDRIQCRAEELQNTERWG  
 LLSQWMVLPKCPPLVHHTLHGPCTNFLVKFVSSRIEAVKLQIVLQMEPQMOSMTKIYRGPLDRPARLCSDV  
 NDIEVTPPEEISTAQPLLHSNSVGSS

Figure 2

A



B

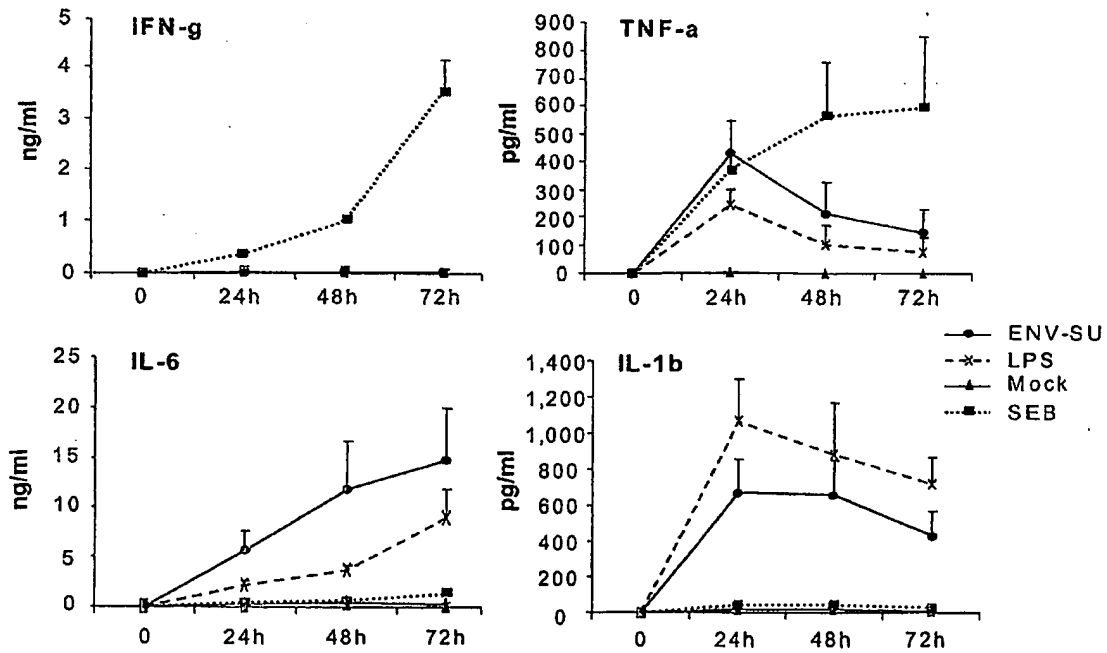


Figure 3

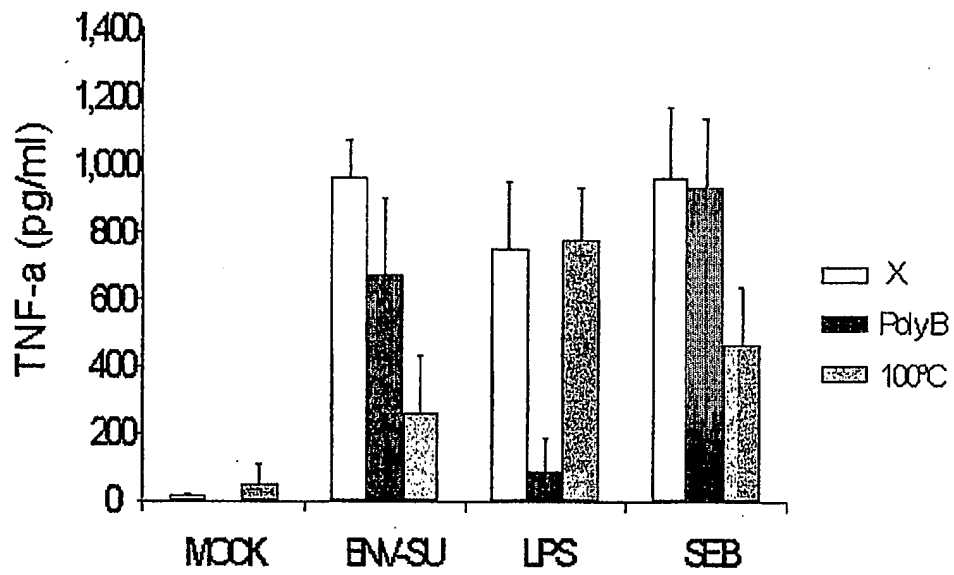


Figure 4

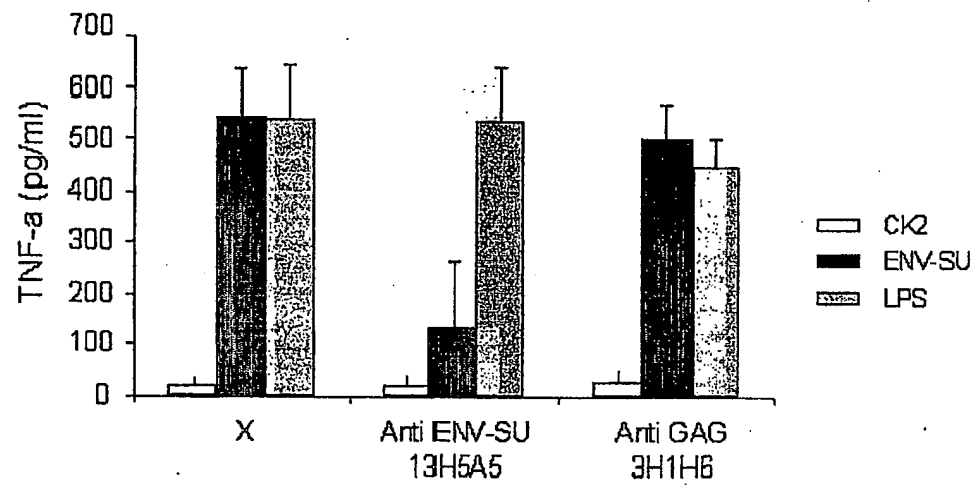


Figure 5

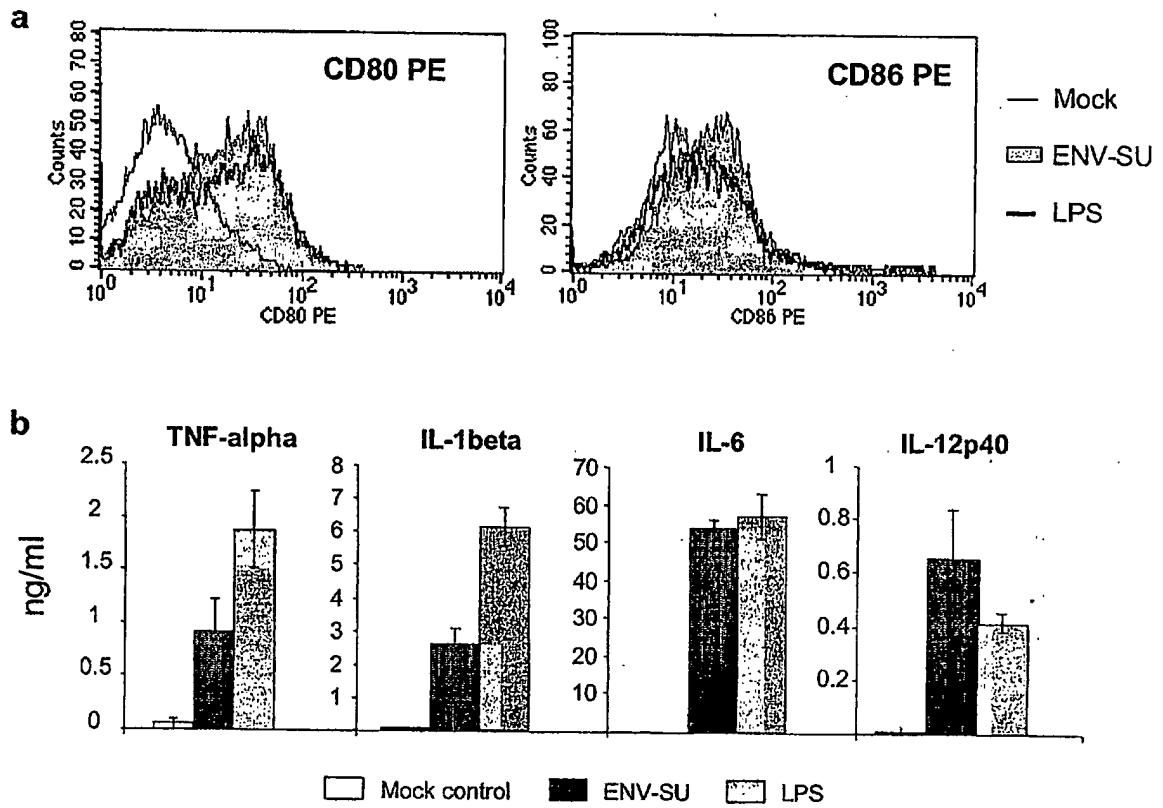


Figure 6

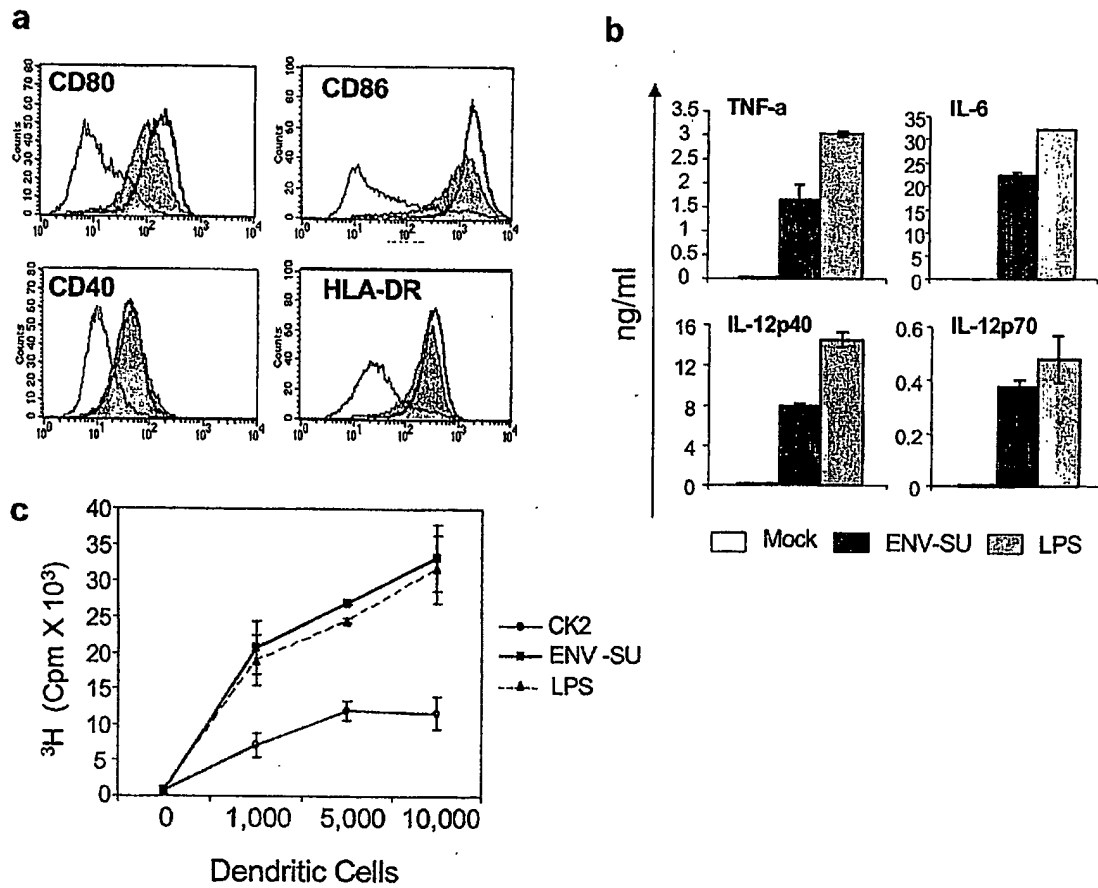
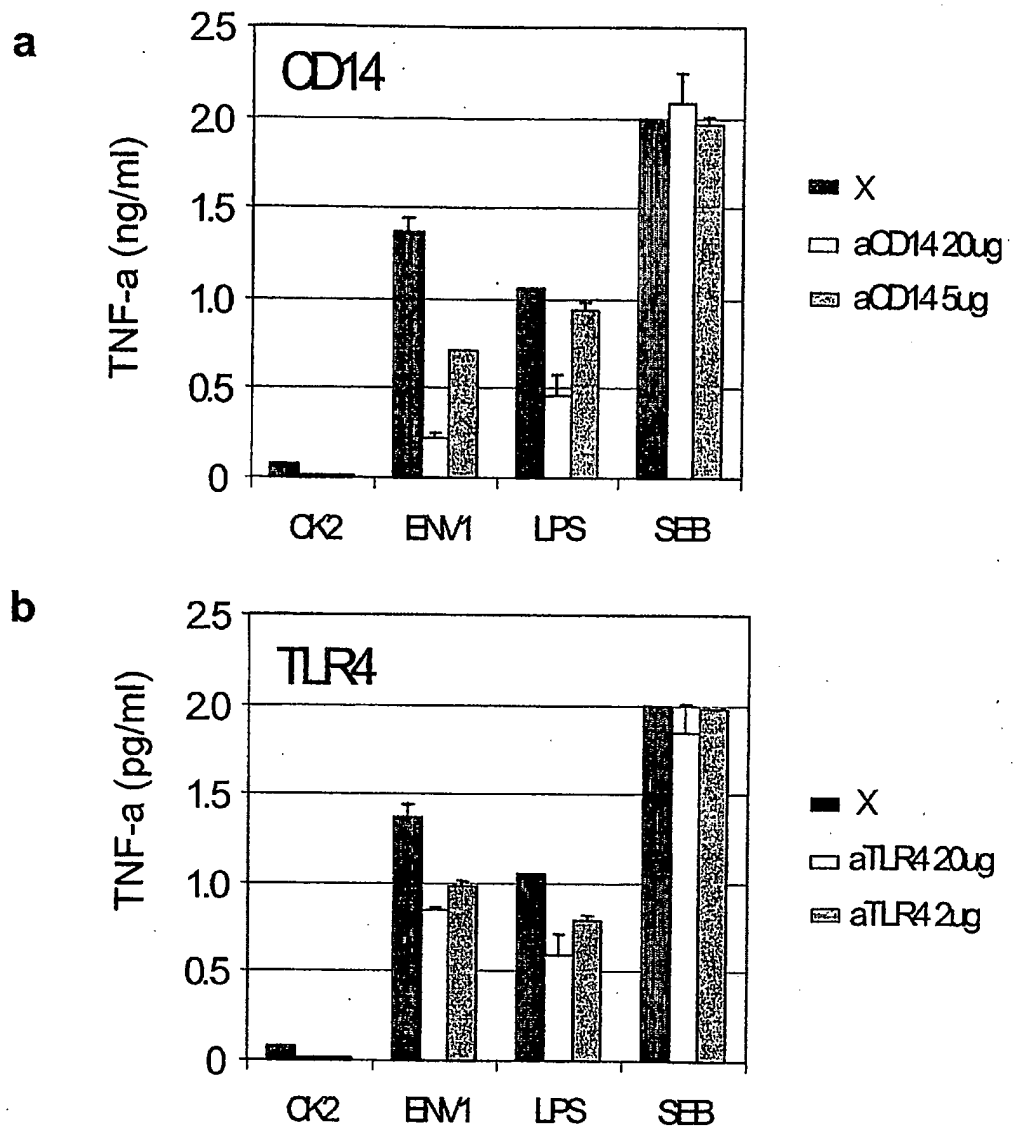




Figure 7



## SEQUENCE LISTING

<110> bioMérieux  
 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

<120> Composition pour le traitement d'une pathologie associée à MSRV/HERV-W

<130> TLR4

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
 <211> 287  
 <212> PRT  
 <213> virus MSRV/HERV-W

<400> 1

Ser	Ser	Ser	Pro	Tyr	Gln	Glu	Phe	Leu	Trp	Arg	Thr	Arg	Leu	Pro	Gly	1	5	10	15
Asn	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu	Ser	Lys	Gly	Asn	Ser	Thr	20	25	30	
Phe	Thr	Ala	His	Thr	His	Met	Pro	Arg	Asn	Cys	Tyr	Asn	Ser	Ala	Thr	35	40	45	
Leu	Cys	Met	His	Ala	Asn	Thr	His	Tyr	Trp	Thr	Gly	Lys	Met	Ile	Asn	50	55	60	
Pro	Ser	Cys	Pro	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Thr	Val	Cys	Trp	Thr	Tyr	Phe	65	70	75	80
Thr	His	Thr	Ser	Met	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly	Ile	Gln	Gly	Gln	Ala	Arg	85	90	95	
Glu	Lys	Gln	Val	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Gly	His	Ser	100	105	110	
Thr	Pro	Ser	Pro	Tyr	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Glu	Thr	115	120	125	
Leu	Arg	Thr	His	Thr	Arg	Leu	Val	Ser	Leu	Phe	Asn	Thr	Thr	Leu	Thr	130	135	140	
Arg	Leu	His	Glu	Val	Ser	Ala	Gln	Asn	Pro	Thr	Asn	Cys	Trp	Met	Cys	145	150	155	160
Leu	Pro	Leu	His	Phe	Arg	Pro	Tyr	Ile	Ser	Ile	Pro	Val	Pro	Glu	Gln	165	170	175	
Trp	Asn	Asn	Phe	Ser	Thr	Glu	Ile	Asn	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Val	Gly	180	185	190	
Pro	Leu	Val	Ser	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	His	Thr	Ser	Asn	Leu	Thr	Cys	195	200	205	
Val	Lys	Phe	Ser	Asn	Thr	Ile	Asp	Thr	Thr	Ser	Ser	Gln	Cys	Ile	Arg	210	215	220	

Trp Val Thr Pro Pro Thr Arg Ile Val Cys Leu Pro Ser Gly Ile Phe  
225 230 235 240

Phe Val Cys Gly Thr Ser Ala Tyr His Cys Leu Asn Gly Ser Ser Glu  
245 250 255

Ser Met Cys Phe Leu Ser Phe Leu Val Pro Pro Met Thr Ile Tyr Thr  
260 265 270

Glu Gln Asp Leu Tyr Asn His Val Val Pro Lys Pro His Asn Lys  
275 280 285



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1. / 2.

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		TLR4
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0400675
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Composition pour le traitement d'une pathologie associée à la MSRV/HERV-W.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
- bioMérieux		
- Institut National de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.)		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	MARCHE
	Prénoms	Patrice
Adresse	Rue	2 allée du Gaillet
	Code postal et ville	13 181 214 01 MEYLAN
Société d'appartenance (facultatif)		INSERM
<b>2</b>	Nom	ROLLAND
	Prénoms	Alexandre
Adresse	Rue	8 rue de l'Ovalie
	Code postal et ville	13 181 316 10 SASSENAGE
Société d'appartenance (facultatif)		INSERM
<b>3</b>	Nom	JOUVIN-MARCHE
	Prénoms	Evelyne
Adresse	Rue	2 allée du Gaillet
	Code postal et ville	13 181 214 01 MEYLAN
Société d'appartenance (facultatif)		INSERM
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
DORGET Elisabeth Ingénieur Brevets - PG 10871 Marcy l'Etoile, le 25 août 2004		



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2. / 2.

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		TLR4
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0400675
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Composition pour le traitement d'une pathologie associée à la MSRV/HERV-W.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> - bioMérieux - Institut National de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.)		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b> Nom		PERRON
Prénoms		Hervé
Adresse	Rue	4 allée de la Guignonnière
	Code postal et ville	619121910 SAINT GENIS LES OLLIERES - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		bioMérieux
<b>2</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
DORGET Elisabeth Ingénieur Brevets - PG 10871 Marcy l'Etoile, le 25 août 2004		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.